

研究ノート

栄養素選択的な摂食調節における視床下部弓状核の
エストロゲン受容体の関与

小 玉 智 章, 矢 野 捷 介

(長崎国際大学 健康管理学部 健康栄養学科)

要 旨

性ホルモンであるエストロゲンは、摂食調節に関与する内分泌物質でもあり、このエストロゲンの受容体は、脳内では摂食調節に重要な神経核である視床下部弓状核に非常に多く発現している。また、摂食の調節は摂取するエネルギー量のみには規定されているものではなく、摂取する栄養素のそれぞれに対する選択的な調節機構も存在し、これはしばしば嗜好性という形で現れる。本実験では、マクロ栄養素（糖質、脂質及びタンパク質）のそれぞれに特化した3種類の食餌をラットに同時に与え、自由に選択摂食させる手法（self-selection法）を用いて、ラットの個々の嗜好性を同定するという生理学的な検討に加え、そのラットの視床下部領域における摂食調節に関わるエストロゲン受容体の分布を組織化学的に検討した。これらマクロ栄養素に対する嗜好性とエストロゲン受容体の発現との相関を検証し、嗜好性に対するエストロゲンの作用を明らかにする。

キーワード

摂食、エストロゲン、視床下部弓状核

神経性食欲不振症（AN）および神経性大食症（BN）を初めとする摂食障害の患者数はわが国において年々増加しており、また精神疾患の中でも致死率が高いため、深刻な問題となっている¹⁾。摂食障害は主に心理的要因を発端として起こる精神疾患であるが、その本態は摂食調節の異常であり、病状の進行には生理的な摂食調節の破綻が生じていると考えられるため、その調節メカニズムの詳細な解明が望まれている。

ANおよびBNは特に思春期の女性に多くみられ、その理由としては無理なダイエットやストレスなどの精神的な要因が多分に考えられるが、女性特有の生理的变化も起因している可能性がある。この生理的な特徴として第一に挙げられるのが性周期である。性周期は主に性ホルモンの分泌量の増減によって形成される。特にその変化が顕著なものの一つがエストロゲンで

あり、卵胞の成熟に従ってその分泌量が増加し、その後受精がなければ急激に減少する。このエストロゲンはまた、摂食調節にも関わっていることが知られている。ラットにおいて、その性周期に従って循環エストロゲン量は変動するが、それに対応して摂食量も変化するという報告がある^{2,3)}。この摂食量の周期的な変化は、卵巣を摘出すると消失し、その後エストロゲンを周期的に投与するとそれに応じて摂食量が増加したことから、エストロゲンと摂食調節との関わりについて疑う余地はない。前述の、ANあるいはBNの発症が思春期の女性に多いのは、この時期に第二次性徴を迎えることで変動が激しくなるエストロゲンの動態にも起因しているのかもしれない。

エストロゲンは主に卵胞（卵巣）から分泌されるが、その受容体は全身に広く分布している。エストロゲン受容体（ER）は核内受容体

であり、リガンドであるエストロゲンと結合することで活性化し、ある特定の遺伝子発現を制御する転写因子となる。ER は、中枢では摂食調節に関わる視床下部弓状核に密集して存在していることから、エストロゲンが摂食調節に関わる課程において、この部位での受容体の分布および発現量が摂食調節に関与していると考えられる。またその分布には性差も認められているため、前述のように摂食障害の病態に関与していることも予想される。

ところで、摂食の調節は摂取するエネルギーのみに規定されている訳ではなく、摂取する栄養素それぞれの量あるいは質にも対応し、これはしばしば嗜好性という形で現れる。この嗜好性として現れる栄養素選択的な摂食調節のメカニズムについて検討されている研究は、エネルギー量に規定された摂食調節に対するそれと比較すると数が少ない。しかしながら摂食障害などの予防および改善には摂食調節メカニズムの詳細な解明が必要であり、栄養素選択的な摂食調節についても検討が必要である。筆者らはこれまでの研究において、ラットに対して糖質、脂質およびたんぱく質といった三大栄養素のそれぞれに特化した3種類の実験食を同時に与えて自由に選択摂食させたところ、同じ条件で飼育しているにもかかわらず個体によってそれぞれの実験食の摂食量は異なった^{4,5)}ことから、この手法によって栄養素選択的な摂食調節が検討できる可能性が示されている。

今回はエストロゲンによる栄養素選択的な摂食調節を解明するための基礎的な実験として、摂食調節に関わる主要な神経核である視床下部弓状核におけるエストロゲン受容体の分布と三大栄養素の摂食量との相関を検証し、その間に相互作用が認められるかどうかを明らかにすることを試みる。

1. 実験方法

動物の管理は長崎国際大学動物実験に関する規程および長崎国際大学健康管理学部及び健康

表1 実験食の組成

	糖質食	タンパク質食	脂質食
	(g/kg)	(g/kg)	(g/kg)
ミルクカゼイン	-	935	-
α コーンスターチ	623	-	-
シュクロース	312	-	-
硬化パーム油	-	-	770
菜種油	-	-	70
大豆油	-	-	30
ミネラル混合(AIN 93M)	35	35	70
ビタミン混合(AIN 93)	10	10	20
セルロース	20	20	40

管理学研究科動物実験指針に基づき行った。

7匹のSprague-Dawley (SD)系雄性ラット(350~400 gBW, 田川実験動物)を用いた。ラットは個別のステンレスケージで、12時間明暗サイクル(7:00点灯)室温一定(22℃)下で管理した。3種類の実験食(糖質食、タンパク質食および脂質食)を同時に与え、ラットに自由選択摂食させた。実験食の組成は表1に示す。摂食量は毎日10:00に重量を測定し、熱量に換算した。10日間の安定した摂食量を平均し、そのラットの摂食パターンとして同定した。

10日間の摂食量が安定したら、ラットをペントバルビタールナトリウムによって麻酔し、灌流固定を行った。脳を取り出し、固定液(4%パラホルムアルデヒドおよび0.5%グルタルアルデヒド溶液)に48時間浸漬した。浸漬液を30%シュクロース溶液に置き換えた後、凍結ブロックを作成した。クライオスタットを用いて20 μm厚の切片を作成し、免疫組織染色を行った。0.1% PBS中で5分間インキュベートした後、内在性のペルオキシダーゼを失活させるために0.01% H₂O₂ in MetOHで室温15分インキュベートし、0.1% PBSで5分間3回洗浄した。非特異的な抗体反応をブロッキングするために、10%正常ヤギ血清 in 1% BSA/PBS中に室温2時間インキュベートした。その後、1次抗体として10,000倍希釈した rabbit anti rat-ERα

IgG(ミリポア社)を用い、4℃で一晩インキュベートした。0.075% Brij35 in PBS で15分3回洗浄した後、2次抗体として100倍希釈したHRP 標識 goat anti rabbit IgG(コスモバイオ社)中で室温1時間インキュベートした。0.075% Brij35 in PBS で15分3回洗浄した後、DAB、コバルトおよびニッケル溶液で発色させた。

染色像をPCに取り込み、ImageJを用いて視床下部弓状核に発現しているER α 陽性細胞数をカウントした。それぞれのラットにおいて片側領域について延べ7～10枚の細胞数をカウントし、平均した。

以上で求められた三大栄養素の摂食量および総摂食量と視床下部弓状核におけるER α 陽性細胞数との相関を、SPSS 16.0Jを用いて解析した。

2. 結 果

各ラットの10日間の平均摂食量を表2に示す。いずれのラットも期間内の摂食パターンの変動が少なく、一定した嗜好性を示した。No.1のラットは、糖質食を約44 kcal/日、タンパク質食を約40 kcal/日および脂質食を約2 kcal/日摂食し、これを総摂食量に対する比率にすると、糖質食が約50%、タンパク質が約47%および脂質食が約3%という結果になった。No.2のラットは糖質食の摂食比率が約63%、タンパク質のそれが約37%となり、やや糖質嗜好性を

示した。No.3のラットはNo.1と同様、糖質食とタンパク質食の摂食比率が同程度であった。No.4、5および6のラットは糖質食の摂食比率がそれぞれ約37%、約36%および約31%、タンパク質のそれがそれぞれ約63%、約63%および約68%であり、ややタンパク質嗜好性を示した。No.7のラットは糖質食の摂食比率が約20%、タンパク質食のそれが約80%であり、強いタンパク質嗜好性が認められた。すべてのラットにおいて、脂質の摂食量はわずかであった。

視床下部弓状核におけるER α の免疫染色像例を図1に示した。The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates, compact 3rd edition⁶を参考に(図1-A)視床下部弓状核の領域にER α 陽性細胞の染色を確認した(図1-B)。この像からImageJを用いてER α 陽性細胞数をカウントすると、表2に示した結果となった。陽性細胞数は最少で平均約33個、最多で平均約67個となり、それぞれのラットの間で個体差が認められた。

このER α 陽性細胞数と、それぞれの実験食の摂食量および総摂食量との相関を検証した(図2および表2)。糖質食、たんぱく質および脂質の摂食量および総摂食量と、ER α 陽性細胞数との相関係数はそれぞれ0.320、-0.198、0.070および0.334となり、いずれの間にも有意な相関は認められなかった。

表2 ER α 陽性細胞数および摂食量

No.	ER α 陽性細胞数	摂食量 (kcal)				摂食比率 (%)		
		糖質食	タンパク質食	脂質食	総摂食量	糖質食	タンパク質食	脂質食
1	50.7 \pm 2.5	43.6 \pm 2.7	39.7 \pm 2.1	2.4 \pm 0.9	85.7 \pm 3.1	50.7 \pm 2.1	46.6 \pm 2.3	2.7 \pm 0.9
2	61.3 \pm 2.8	54.8 \pm 1.7	31.9 \pm 0.9	0.0 \pm 0.0	86.8 \pm 2.1	63.1 \pm 0.9	36.8 \pm 0.9	0.0 \pm 0.0
3	32.7 \pm 3.5	34.0 \pm 1.1	41.2 \pm 0.8	0.5 \pm 0.1	75.7 \pm 1.3	44.9 \pm 1.0	54.5 \pm 1.1	0.6 \pm 0.2
4	65.3 \pm 5.2	30.9 \pm 1.0	52.6 \pm 1.7	0.4 \pm 0.2	83.9 \pm 1.9	36.9 \pm 1.1	62.6 \pm 1.1	0.5 \pm 0.2
5	39.4 \pm 3.9	32.2 \pm 1.2	56.7 \pm 2.1	0.6 \pm 0.5	89.6 \pm 2.6	36.0 \pm 1.0	63.3 \pm 1.1	0.7 \pm 0.3
6	67.2 \pm 2.4	23.8 \pm 1.1	51.4 \pm 1.6	0.8 \pm 0.3	76.0 \pm 2.1	31.3 \pm 1.1	67.7 \pm 1.2	1.0 \pm 0.4
7	33.0 \pm 2.1	13.7 \pm 1.3	56.0 \pm 1.0	0.1 \pm 0.0	69.7 \pm 1.9	19.3 \pm 1.5	80.6 \pm 1.5	0.1 \pm 0.1

(mean \pm SD、総摂食量 = 糖質食 + タンパク質食 + 脂質食 = 100%)

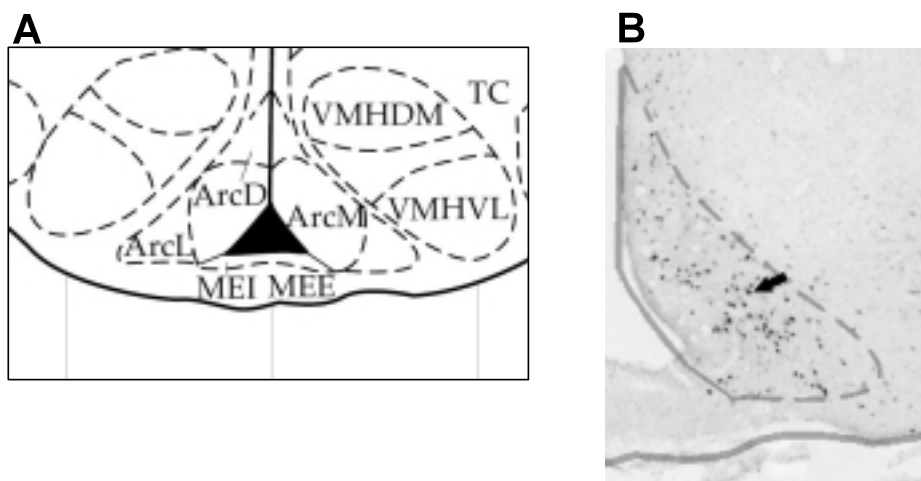


図 1 視床下部弓状核における ER α の発現

(A) Bregma から後方 3.30 mm における視床下部弓状核 (ArcD、ArcL および ArcM) の模式図⁵⁾(B)視床下部弓状核領域における ER α 陽性細胞 (矢印) の染色図

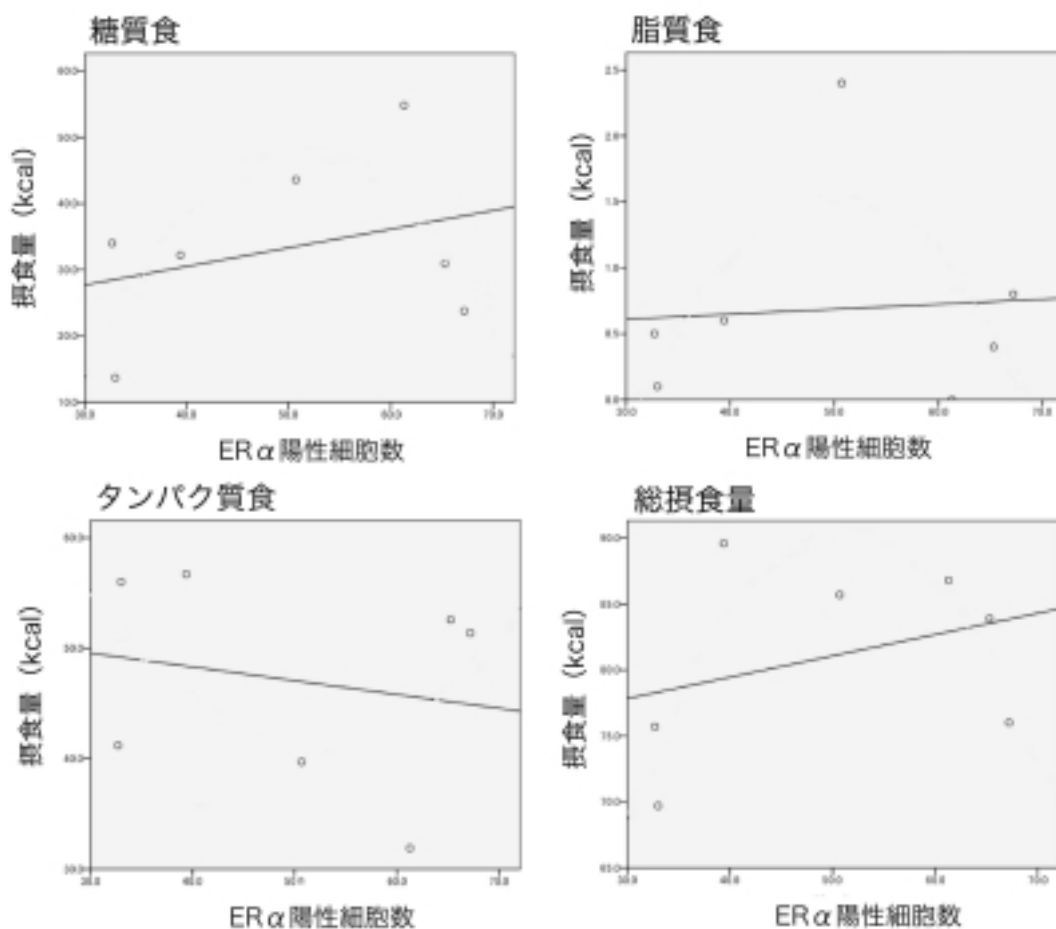


図 2 摂食量と ER α 陽性細胞数との相関

3. 考 察

本実験では、エストロゲンによる栄養素選択的な摂食調節への関与を明らかにするために、その受容体である ER α と摂食行動との相関について検証した。

栄養素選択的な摂食調節を検討するために、本実験では糖質、脂質およびタンパク質といった三大栄養素のそれぞれに特化した3種類の実験食を同時に与えて自由に選択摂食させる給餌方法を用いた。その結果、それぞれのラットにおいて異なる栄養素の選択が認められた。今回用いた7匹のラットのうち、糖質を選択する傾向があったのが1匹、糖質とタンパク質を同程度選択したのが2匹、タンパク質を選択する傾向があったのが4匹であった。特に、タンパク質を選択する傾向があったラットのうち1匹は、総摂取エネルギーの8割をタンパク質から摂取していた。これまで摂食調節について検討した研究において、その実験食には多くがその栄養素組成が固定された食餌が用いられていたが、この方法では総摂取エネルギーに対する調節について検討することはできるが、個々の栄養素に対する調節については検討することができない。本研究で用いた3種類の実験食による自由選択摂食法によって、三大栄養素のそれぞれに対する摂食調節について検討することができることが示唆された。

エストロゲンは性ホルモンの一つであるが、摂食調節にも関わっていることが知られている。このエストロゲンの受容体である ER α は、中枢では視床下部弓状核に分布している。視床下部弓状核には、グレリン、ニューロペプチド Y およびアグーチ関連ペプチドなど、摂食調節に関わる内分泌物質を含むニューロンが局在し

ており、ER α もこの神経核に分布していることから、エストロゲンがこれらニューロンを介して摂食調節に関与していると考えられる。本実験では、前述の摂食量を測定したラットにおいてこの視床下部弓状核に発現している ER α を免疫組織染色によって可視化し、画像解析によってその量を測定した。ER α 陽性細胞数と、それぞれの実験食の摂食量の相関を検証すると、いずれも有意ではなかったものの、総摂食量および糖質食の摂食量において正の相関を示す傾向にあった。つまり、視床下部弓状核に ER α が多く発現するに従って糖質を選択するようになり、その結果総摂取エネルギーも多くなると考えられる。一方、タンパク質食の摂食量と視床下部弓状核の ER α の発現との間には負の相関を示す傾向にあった。これは ER α の発現が多くなるにつれてタンパク質の摂取を選択的に抑えていることが考えられる。結果には示していないが、SPSS を用いて ER α 陽性細胞数とそれぞれの摂食量との間で曲線推定をすると、糖質食、脂質食および総摂食量との間では上凸の、タンパク質食との間では下凸の2次関数となる可能性も示された。つまり、ある数(今回の結果では陽性細胞数約50)までは ER α 陽性細胞が増えるに従って糖質食を選択しタンパク質食を避け、それ以降はタンパク質食を選択し糖質食を避ける傾向があるとも考えられる。いずれにせよ今回の実験では例数が少ないこともあり、ER α の発現と摂食行動との相関について直線あるいは曲線に回帰するかは同定できなかった。しかしながら視床下部弓状核の ER α の分布を基にして考えた場合、糖質食とタンパク質食のそれぞれに対して相反した選択をしているようである。これはエストロゲンがこれら

表3 ER α 陽性細胞数と摂食量との相関係数

		摂食量				摂食比率		
		糖質食	タンパク質食	脂質食	総摂食量	糖質食	タンパク質食	脂質食
ER α 陽性細胞数	相関係数(r)	0.320	-0.198	0.070	0.334	0.298	-0.300	0.092
	有意確率(p)	0.483	0.670	0.881	0.464	0.516	0.513	0.844

栄養素の選択的な摂食調節に深く関与している可能性を示している。今後、例数を増やすことでより確実な結論が得られると思われる。

本実験は、栄養素選択的な摂食調節に関与する因子としてエストロゲンに着目し、その受容体の分布との関連について初めて検討された事例である。その結果、今回用いた実験系によって栄養素選択的な摂食調節について検討できることが示され、この調節機構にはエストロゲンが関与している可能性が明らかになった。本実験ではエストロゲンの循環量が通常一定である雄性ラットを用いたが、今後はそれが周期的に変化する雌性ラットを用いて栄養素選択的な摂食調節の詳細な検討を行っていく。冒頭に記載したように、神経性食欲不振症や神経性大食症といった摂食障害は性成熟過程の女性に多く認められるため、この時期に大きく変動するエストロゲンの関与が解明されれば、これら障害の予防および改善に寄与できることが期待される。

References

- 1) 切池信夫 (2000) 『摂食障害 - 食べない, 食べられない, 食べたらずまらない - 第1章 摂食障害の概念と歴史』医学書院
- 2) Asarian, L., Geary, N. (2002) 'Cyclic estradiol treatment normalizes body weight and restores physiological patterns of spontaneous feeding and sexual receptivity in ovariectomized rats.' *Horm Behav* 42, PP. 461-471.
- 3) Asarian, L., Geary, N. (2006) 'Modulation of appetite by gonadal steroid hormones.' *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 361, PP. 1251-1263.
- 4) Kodama T. (2006) 'The infusion of a small amount of insulin into the hepatic portal vein selectively increases carbohydrate intake.' *Journal of Kyoto prefectural University of Medicine* 116(2), PP. 83-92.
- 5) Kodama T. (2005) 'The preloading low-dose of D-glucose selectively increased carbohydrate intake in self-selecting rats.' *Journal of Kyoto prefectural University of Medicine* 114(9), PP. 581-589
- 6) Paxinos, G, Watson, C. (1997) *The rat brain in stereotaxic coordinates, compact third edition*. Academic press, San diego.